مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۵، شماره ۱، سال ۱۳۸۳ (۲۶۳-۲۵۳)

مقایسه‌ی جدایه‌های *Pseudomonas viridiflava* از میزبانهای مختلف از نظر خصوصیات فنوتیپی و بیماریزایی در استان فارس

محمدرضی نتاج[1] و سیدمحسن تقوی[2]
۱، ۲، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۲/۲۵

خلاصه

به منظور مقایسهٔ جدایه‌های *Pseudomonas viridiflava (Pv)* از نظر خصوصیات فنوتیپی و بیماریزائی طی سالهای ۱۳۷۸-۱۳۷۹ از گیاهان، مرکبات، درختان میوهٔ هسته‌دار، گندم، خیار، خاک و علف‌های هرز در استان فارس و همچنین از انبه در میناب نمونه‌برداری گردید. تعداد ٤٩ جدایه که از لحاظ اکسیداز، تولید لوان و هیدرولیز آرژنین منفی ولی در تحریک واکنش فوق حساسیت در توتون و یا شمعدانی و توانائی تولید پوسیدگی نرم روی سیب‌زمینی مثبت بودند و همچنین ۱۱ جدایه که قادر به ایجاد لهیدگی در سیب‌زمینی و استفاده از سوکروز نبودند مقدمتا به عنوان *Pv* انتخاب و آزمون‌های تکمیلی روی آنها انجام شد. در بین کلنی‌های مورد مطالعه ۳ نوع کلنی مشاهده گردید. کلیه جدایه‌ها قادر به استفاده از اریتریول و دی، ال – لاکتات بوده و بر اساس آزمون‌های LOPAT (تولید لوان، اکسیداز، لهانیدن سیب‌زمینی، هیدرولیز آرژنین و تحریک واکنش فوق حساسیت) به ٤ گروه تقسیم شدند.

واژه‌های کلیدی: *Pseudomonas viridiflava* ، لهیدگی نرم، خصوصیات فنوتیپی و بیماریزائی.

مقدمه

باکتری *Pseudomonas viridiflava (Pv)* دامنهٔ میزبانی وسیعی داشته و در بسیاری از گیاهان، شانکر، بلایت و لکه‌برگی ایجاد کرده و نیز باعث پوسیدگی میوه و سبزیجات پس از برداشت می‌شود (۳). نام این باکتری اغلب با اصطلاحات مهم، رورست[1]، مهاجم ثانوی[2]، پارازیت ضعیف[3] و پوسیدگی نرم[4] همراه می‌باشد (۷، ۲۳). نقش *Pv* بصورت یک بیمارگر گیاهی توسط محققان مختلف مورد توجه قرار گرفته است (۱۹). این باکتری تاکنون از گیاهان زیادی نظیر: بادنجان، گل داوودی، گوجه فرنگی (۱۰)، کیوی (۲۳)، توتون (۱) و هسته‌داران مانند بادام (۵) جدا شده است. همچنین از مرکبات (۳) و سبزیجاتی مانند ریحان، اسفناج و همیشه بهار (۴، ۶) جدا گردیده است.

جدایه‌های *Pv* اکثرا دارای آنزیم‌های پاکتولیتیک بوده و قدرت لهانیدن برش‌های سیب زمینی، هویج، پیاز و غیره را در آزمایشگاه دارند (۹). اما برخی جدایه‌ها قادر به لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاهی نیستند (۲۲). باکتری مذکور در محیط پلی پکتات سدیم[5] در pH=۷-۸/۵ و روی محیط دو لایهٔ Paton ایجاد حفره می‌کند که حاکی از فعالیت پکتولیتیک آن می‌باشد ولی در pH=۵ قادر به ایجاد حفره نیست (۹، ۲۳). اکثر جدایه‌های *Pv* باعث واکنش فوق حساسیت در توتون می‌شوند (۱). همچنین در هیدرولیز نشاسته (۱، ۹) و استفاده از سوکروز (۷، ۱۸) واکنش متغیری دارند به طوری که اغلب منفی می‌باشند.

مکاتبه کننده: محمدرضی نتاج

1 . Epiphyte
2 . Secondary invader
3 . Weak Parasite
4 . Soft rot
5 . Sodium – polypectate

جدایه‌های این باکتری از اریتریتول و دی، ال – لاکتات استفاده می‌کنند. به طوریکه این خصوصیات به همراه عدم استفاده از سوکروز مبنای تفکیک این گونه از *P. syringae* pv. *syringae (Pss)* و *P. syringae* pv. *tomato* (می‌باشد (۱۱، ۱۸).

در مقایسهٔ بین جدایه‌های ریحان، اسفناج، توتون، همیشه بهار و مرکبات در استان مازندران، جدایه‌های فوق از لحاظ خصوصیات فنوتیپی، نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی و آزمون‌های سرولوژیکی و نوع پلاسمید نسبتا یکنواخت بودند ولی از نظر نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی تا حدودی با جدایهٔ استاندارد *Pv* تفاوت داشتند (۶). از نظر بیماریزائی بین جدایه‌های مرکبات با جدایه‌های دیگر، نیز تفاوت‌هائی دیده شده است (۶).

پژوهش حاضر به منظور مقایسهٔ جدایه‌های *Pv* از درختان میوهٔ هسته‌دار شامل: بادام (*Prunus domestica*)، آلو (*P. dulcis*) زردآلو (*P. armeniaca*) و هلو (*P. persica*) ، نارنج (*Citrus bigaraia*) ، گندم (*Triticum aestivum*)، ریحان (*Ocimum basilicum*) ، برخی علف‌های هرز از جمله، سلمه(*Chenopodium album*)،خردل‌وحشی(*Sinapis alba*)، و شنگ (*Tragopagon* sp.)، خیار (*Cucumis sativus*) ، انبه (*Mangifera indica*) و خاک، از نظر خصوصیات فنوتیپی و بیماریزائی در استان‌های فارس و میناب صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

از جوانه‌های خفته، شکوفه‌ها، برگ‌ها، شاخه‌های جوان و دارای علائم شانکر درختان میوهٔ هسته‌دار، (هلو، بادام، زردآلو و گیلاس) برگ‌ها و شاخه‌های جوان مرکبات، (نارنج، لیمو و پرتقال) برگ‌های گندم، ریحان و علف‌های هرز در فصول خنک و مرطوب سال (از اردیبهشت ماه ۱۳۷۸ لغایت خرداد ماه ۱۳۷۹) در مزارع و باغات واقع در شهرستان‌های شیراز، سپیدان، مرودشت، سعادت شهر، خفر، نی‌ریز، استهبان، مهارلو و میناب نمونه‌برداری گردید.

جهت جداسازی، شاخه‌های آلوده به شانکر ابتدا با آب شسته و سپس با هیپوکلریت سدیم (محلول ۱۰ درصد) (حجم به حجم) (از نوع تجاری موجود در بازار) به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی گردید. با چاقوی سترون پوست را در محل شانکر کنار زده و از حد فاصل بافت آلوده و سالم قطعاتی به ابعاد نیم سانتی‌متر برداشته و به درون ۲-۳ میلی‌لیتر آب مقطر سترون انتقال داده شد. بعد از له نمودن قطعات گیاهی درون آب مقطر سترون، یک ساعت در دمای اطاق نگهداری و یک لوپ[1] از سوسپانسیون به دست آمده روی محیط آگار مغذی [2] مخطط گردید (۴). تشتک‌های ۲ الی ۴ روز در دمای ۲۵ °C نگهداری و تک پرگنه‌های ظاهر شده روی محیط NA بصورت نقطه‌ای روی محیط کشت King-B کشت (۱۲) و پس از ۲ الی ۵ روز کلنی‌های مولد رنگدانهٔ فلورسنت انتخاب گردید.

برگ‌ها و شاخه‌های جوان، سالم و بدون علائم مرکبات، جوانه‌ها و شکوفه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، برگ ریحان، گندم، انبه و علف‌های هرز به قطعات کوچک تقسیم و در فلاسک‌های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار و ۰/۱ درصد پپتون اضافه و به مدت ۲ ساعت روی دستگاه تکان دهنده با ۳۰۰ حرکت در دقیقه قرار گرفتند. از عصارهٔ هر نمونه جهت جداسازی باکتریهای اپی‌فیت طبق روش فوق روی محیط آگار مغذی و King-B کشت داده شد (۱۲).

یک جدایهٔ *Pv* از آمریکا (اهدایی دکتر آزاد به شماره 0893-8، دانشگاه کالیفرنیا ریورساید) و دو جدایهٔ *Pv* از مرکبات مازندران (اهدایی دکتر رحیمیان، دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه مازندران) نیز به عنوان استاندارد در کلیهٔ آزمون‌ها استفاده گردید.

بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط King-B (۱۲)، آزمون گرم بر اساس روش ساسلو و همکاران (۱۹۸۲) و شاد (۱۹۸۸)، آزمون‌های LOPAT مطابق روش لیلیوت و همکاران (۱۹۶۶) و کلمنت و همکاران (۱۹۶۴) کاتالاز، اوره‌آز، هیدرولیز نشاسته، رشد هوازی و بی‌هوازی، لستیناز، رشد در ۴۱°c، تولید استوئین، تشکیل هسته یخ، هیدرولیز ژلاتین و تعیین تحرک باکتری بر اساس روش فهی و پرسلی (۱۹۸۳) انجام شد. آزمون‌های احیای نیترات، هیدرولیز توئین ۸۰، تولید ۳- کتولاکتوز، تولید ایندول،

1 . Loopful

2 . Nutrient Agar= NA

هیدرولیز کازئین، شیر لیتموس، تولید گاز از سیستئین، متیل رد، استفاده از قندها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه و الکلها، واکنش جدایه‌ها به آنتی بیوتیکها و تحمل به نمک طعام بر اساس روش شاد (۱۶) انجام شد. سایر آزمونها به روشهای استاندارد باکتری شناسی انجام گرفت (۸، ۱۶).

اثبات بیماریزائی

از میوه‌های نارس گیلاس، نهال‌های ۲ تا ۳ سالهٔ بادام و مرکبات و گیاهان گندم و ریحان برای اثبات بیماریزایی استفاده گردید. میوه‌های نارس گیلاس با هیپوکلریت سدیم (محلول ۱۰ درصد (حجم به حجم) از نوع تجاری) به مدت ۱۰دقیقه ضد عفونی سطحی و با آب مقطر سترون آبکشی شد. برای هر جدایه سوسپانسیونی به غلظت 1×10^{6} سلول باکتری در میلی‌لیتر (تعیین شده به روش اسپکتروفتومتری) تهیه و ۰/۲ میلی‌لیتر از آن توسط سرنگ به زیر پوست هر میوه در ۳ نقطه مایه‌زنی شد. همچنین روی هر میوه یک نقطه به عنوان شاهد با آب مقطر سترون مایه‌زنی گردید. میوه‌ها درون پاکت‌های پلاستیکی حاوی مقداری پنبهٔ مرطوب در دمای اتاق به مدت پنج الی هفت روز نگهداری و نتایج ارزیابی گردید (۷).

برای اثبات بیماریزایی روی گندم و ریحان، بیست و چهار ساعت قبل از مایه‌زنی گلدانهایی حاوی گیاهان رشد یافته با استفاده از کیسه‌های پلاستیکی پوشانده تا شرایط رطوبت اشباع اعمال گردد. از کشت ۲۴-۴۸ ساعتهٔ باکتری سوسپانسیونی به روش فوق تهیه و در مرحله ۴ تا ۶ برگی توسط مه‌پاش روی برگ‌های گیاهان فوق پاشیده شد. همچنین بوته‌های ریحان با استفاده از پنبهٔ مرطوب آغشته به سوسپانسیون باکتری (Cotton swab) مایه‌زنی شدند. گلدان‌ها پس از مایه‌زنی برای ۴ الی ۵ ساعت توسط پاکت‌های پلاستیکی پوشانده و در شرایط گلخانه تا بروز علائم قرار گرفتند. در این آزمون از جدایه‌های گندم، ریحان، مرکبات و درختان میوهٔ هسته‌دار هر کدام یک نماینده برای هر تیمار نیز سه تکرار در نظر گرفته شد. یک گلدان نیز از هر گیاه به عنوان شاهد با آب مقطر سترون مایه‌زنی شد (۱۷).

جهت اثبات بیماریزایی روی نهال‌های بادام، پرتقال و نارنج، از نهال‌های ۲ تا ۳ سالهٔ گیاهان مذکور استفاده گردید. برای کلیهٔ جدایه‌های سوسپانسیونی به روش فوق تهیه و از هر جدایه به یک نهال بادام (نمایندهٔ درختان میوه هسته‌دار) و یک نهال پرتقال یا نارنج (نمایندهٔ مرکبات) در سه نقطهٔ درخت شامل پهنک برگ، محل افتادن برگ و محل زخم ایجاد شده توسط چاقوی سترون مایه‌زنی انجام و نقاط مایه‌زنی شده در محل زخم و افتادن برگ توسط نوارهای پارافیلم[1] پوشانده شد. نهالهای تیمار شده با آب مقطر سترون به عنوان شاهد استفاده گردید. سه ماه پس از مایه‌زنی نتایج روی شاخه، و ۷ الی ۱۰ روز بعد روی برگ‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند (۷).

الکتروفورز پروتئین‌های سلولی

الکتروفورز به روش Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis داری ژل، ژل جدا کنندهٔ ۱۰ درصد[2] و ژل پایه ۵ درصد[3] پلی آکریل آمید انجام و جدایه‌ها از نظر نقوش پروتئین‌های سلولی مقایسه شدند (۱۴). از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها روی محیط آگار غذایی، سوسپانسیونی تهیه و غلظت آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر و در چگالی نوری ۱ تنظیم گردید. الکتروفورز به مدت ۴ ساعت در ۱۰۰ ولت با شدت جریان ۲۰ میلی‌آمپر انجام گردید. سپس ژل برای رنگ‌آمیزی درون محلول متانول، آب و اسیداستیک (۵: ۵: ۱) حاوی ۰/۱ درصد کوماسی بلو قرار داده و به مدت ۱۲ ساعت در شیکر تکان داده شد. رنگبری به وسیله متانول، آب و اسید استیک به نسبت (۵: ۵: ۱) به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه انجام و در نهایت ژل برای بررسی و مقایسه در اسید استیک ۷ درصد نگهداری و از ژل عکسبرداری گردید (۱۴).

نتایج

جداسازی

در مجموع بیش از ۹۵۰ جدایهٔ باکتری فلورسنت از گیاهان آلوده به شانکر باکتریائی نظیر درختان بادام، زردآلو، هلو و بوته‌های گندم، ریحان، درختان مرکبات، انبه و علف‌های هرز نظیر سلمه، خردل وحشی، شنگ و خاک جداسازی گردید. اغلب جدایه‌های اکسیداز مثبت حذف و ۱۵۰ جدایه اکسیداز منفی انتخاب و آزمون‌های گروه LOPAT روی آنها انجام شد.

1 . Parafilm
2 . Seperating gel
3 . Stacking gel

تعداد ۴۹ جدایه که از نظر اکسیداز و هیدرولیز آرژنین منفی بوده اما روی توتون با شمعدانی یا هر دو موجب تحریک فوق حساسیت شده و در برش‌های سیب‌زمینی ایجاد لهیدگی کردند و همچنین ۱۱ جدایه که از نظر تولید لهیدگی در برش‌های سیب زمینی و مصرف سوکروز منفی بودند مقدمتا به عنوان جدایه‌های *Pv* انتخاب و آزمون‌های تکمیلی روی آنها انجام شد.

از ۶۰ جدایهٔ به دست آمده ۱۲ جدایه از درختان میوهٔ هسته‌دار، ۱۴ جدایه از گندم، ۱۶ جدایه ازمرکبات، ۳ جدایه از خاک، ۶ جدایه از ریحان، ۳ جدایه از خیار، ۲ جدایه از مرکبات شمال و از سلمه، انبه، شنگ و خردل وحشی هر کدام یک جدایه بودند. یک جدایهٔ *Pv* از آمریکا نیز مورد استفاده قرار گرفت.

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

در بین جدایه‌های مورد مطالعه روی محیط کشت NA، سه نوع پرگنه مشاهده شد. پرگنه‌های نوع اول کوچک به قطر ۳-۲ میلیمتر با حاشیهٔ کامل، سطح صاف و براق برنگ کرم بودند. پرگنه‌های نوع دوم سفید شیری به قطر ۲-۱ میلی‌متر بودند. پرگنه‌های نوع سوم در ابتدا لزج بوده که در اثر کشت‌های متوالی خاصیت لزج و حالت موکوئیدی خود را از دست دادند. تمام پرگنه‌ها روی محیط SNA صاف بوده و حالت گنبدی نداشتند.

همهٔ جدایه‌های مورد مطالعه روی محیط کشت KB رنگدانهٔ فلورسنت تولید کردند. اکثر جدایه‌ها روی برگ توتون، شمعدانی یا هر دو باعث تحریک واکنش فوق حساسیت شدند. اما جدایه‌های خیار و سلمه نتوانستند در توتون و شمعدانی فوق حساسیت ایجاد کنند. بر اساس واکنش به آزمون‌های گروه LOPAT جدایه‌ها به ۴ گروه تقسیم شدند گروه اول شامل جدایه‌هائی که در آزمون‌های لوان، اکسیداز و هیدرولیز آرژنین منفی، اما در آزمون‌های لهانیدن سیب‌زمینی و تحریک فوق حساسیت روی توتون یا شمعدانی مثبت بودند. گروه دوم شامل جدایه‌هائی که قادر به تحریک فوق حساسیت روی توتون یا شمعدانی ودر سایر آزمون‌های فوق منفی بودند. گروه سوم جدایه‌هائی که قادر به لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی بوده و در سایر آزمون‌ها منفی بودند. گروه چهارم شامل یک جدایه از سلمه که در تمام آزمون‌ها منفی بود.

کلیهٔ جدایه‌ها کاتالاز و فسفاتاز مثبت بوده و توانستند از گلوکز بصورت هوازی استفاده کنند. همچنین همهٔ جدایه‌ها شیر لتیموس را قلیائی نموده، در آزمون‌های اکسیداز، هیدرولیز آرژنین، مصرف بی هوازی گلوکز، رشد در $41^{\circ}C$، متیل رد، استوئین، احیای نیترات، تولید ۳- کتولاکتوز، رنگ‌آمیزی گرم و تولید ایندول منفی بودند.

همهٔ جدایه‌ها توانستند از زایلوز، دکستروز، گلوکز، اریتریتول، گلیسرول، آسپاراژین، لاکتات، سوکسینات، مالونات و ال – آلانین استفاده کنند. اما هیچکدام قادر به استفاده از پروپیونات، دی، ال – متیونین و اینولین نبودند (جدول ۱).

از بین آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده سیپروفلاکاسین[1]، آمیکاسین[2]، تتراسیکلین[3] و نالیدیکسیک اسید[4] روی تمام جدایه‌ها مؤثر بوده و از رشد آنها جلوگیری کردند. سایر آنتی بیوتیک‌ها واکنش‌های حد واسطی داشتند.

بیماریزائی

بیماریزائی روی میوه‌های نارس گیلاس، درختان بادام و مرکبات: پنجاه و هشت درصد از جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، ۲۱ درصد جدایه‌های گندم، ۸۷/۵ درصد جدایه‌های مرکبات، ۸۳ درصد جدایه‌های ریحان، ۳۳ درصد جدایه‌های خیار و خاک و جدایه‌های شنگ و انبه روی پهنک برگ نهال‌های مرکبات بیماریزا بودند اما جدایهٔ خردل وحشی قادر به ایجاد بیماری نبود (شکل ۱).

در مایه‌زنی از طریق ایجاد زخم روی شاخهٔ بادام، ۷۵ درصد جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، ۵۰ درصد جدایه‌های گندم، ۳۷/۵ درصد جدایه‌های مرکبات، ۳۳ درصد جدایه‌های ریحان و جدایه‌های سایر میزبان‌ها قادر به ایجاد شانکر و سرخشکیدگی روی بادام شدند (شکل ۲). در مایه‌زنی شاخهٔ مرکبات، ۵۰ درصد جدایه‌های هسته‌داران، ۷ درصد جدایه‌های گندم، ۴۴ درصد جدایه‌های مرکبات، ۳۳ درصد جدایه‌های ریحان و خاک روی شاخهٔ مرکبات ایجاد بیماری کردند ولی جدایه‌های خیار،

1. Ciprofloxacin
2 . Amikacin
3 . Tetracyclin
4 . Nalidixic acid

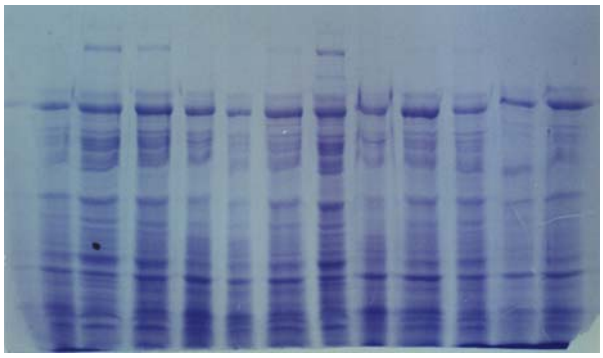
خردل وحشی، شنگ و انبه و سلمه قادر به ایجاد بیماری نبودند (جدول ۲).

شکل ۱- آبسوختگی و مرگ بافت روی پهنک برگ مرکبات مایه‌زنی شده با جدایه PV

شکل ۲- علائم سرخشکیدگی شاخه‌های بادام مایه‌زنی شده با جدایه PV

الکتروفورز پروتئین

در مقایسهٔ نقوش الکتروفورز پروتئین‌های سلولی تفاوت‌هائی بین جدایه‌های خاک، خیار، شنگ و انبه با جدایه‌های مرکبات شمال و ریحان دیده شد. در مقابل بین جدایه‌های گندم، درختان میوهٔ هسته‌دار و مرکبات و نیز جدایهٔ ریحان با جدایهٔ مرکبات شمال شباهت‌هائی وجود داشت (شکل ۳).



شکل ۳- نقوش الکتروفورز پروتئین‌های سلولی جدایه‌های مختلف PV

بحث

کلیهٔ جدایه‌های به دست آمده از میزبان‌های مختلف روی محیط KB مولد رنگدانهٔ فلورسنت بوده و اغلب جدایه‌ها به جز جدایه‌های خیار و سلمه روی برگ توتون با شمعدانی یا هر دو واکنش فوق حساسیت را تحریک نمودند اما در آزمون‌های اکسیداز و هیدرولیز آرژنین منفی بودند. اکثر جدایه‌ها قادر به ایجاد لهیدگی نرم روی سیب‌زمینی بوده ولی تعدادی از جدایه‌ها فاقد این خصوصیت بودند. بر اساس مشخصات و خصوصیات بیوشیمیائی، جدایه‌های به دست آمده به عنوان *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson شناسائی شدند. اکثر محققین خصوصیات اصلی و ثابت *Pv* را تولید رنگدانهٔ فلورسنت، ایجاد واکنش فوق حساسیت روی توتون، منفی بودن آزمون‌های اکسیداز و هیدرولیز آرژنین و تولید لهیدگی روی سیب‌زمینی می‌دانند.

بر اساس آزمون‌های گروه لوپات (LOPAT) جدایه‌ها بدون توجه به دامنه میزبانی به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول شامل ۴۹ جدایه بوده که جدایهٔ استاندارد نیز در این گروه قرار گرفت. سه گروه دیگر بر اساس آزمون‌های LOPAT شبیه جدایه‌های *P. syringae (Ps)* بودند اما بر اساس استفاده از دی، ال – لاکتات و اریتریول و عدم استفاده از سوکروز به عنوان جدایه‌های *Pv* تشخیص داده شدند.

اغلب محققین لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی را یک صفت اساسی *Pv* می‌دانند در صورتیکه جدایه‌هائی نیز گزارش شده‌اند که فاقد این ویژگی بوده یا واکنش ضعیفی داشته‌اند (۹). در پژوهش حاضر ۷۵ درصد جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، ۷۸ درصد جدایه‌های گندم، ۹۴ درصد جدایه‌های مرکبات و همهٔ جدایه‌های ریحان، خاک، خیار، انبه و شنگ قادر به لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی بودند. در مقابل جدایه‌های خردل وحشی و سلمه در این آزمون منفی بودند. اغلب جدایه‌های *Pv* قادر به تولید H_2S از سیستئین نبوده، اما در مطالعات ونتومن و همکاران (۱۹۸۹) ۲۰ درصد جدایه‌های دارای این خصوصیت بودند. در مطالعهٔ حاضر ۳۳ درصد جدایه‌های هسته‌داران، ۲۸ درصد جدایه‌های گندم و ۲۵ درصد جدایه‌های مرکبات قادر به تولید H_2S از سیستئین بوده و بقیهٔ جدایه‌ها منفی بودند.

جدول ۱- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *Pseudomonas viridiflava* از میزبان‌های مختلف

جدایه‌ها / آزمون	A (۱۲)*	B (۱۴)	C (۱۶)	D (۶)	E (۳)	F (۳)	G (۱)	H (۱)	I (۱)	J (۱)	K (۲)	L (۱)
تولید رنگدانهٔ فلورسنت روی KB	۱۲**	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
اکسیداز	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
تولید لوان	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
لهانیدن سیب‌زمینی	۹	۱۰	۱۵	۶	۱	۳	۰	۱	۱	۰	۲	۱
تحریک واکنش فوق حساسیت:												
توتون	۴	۱۱	۱۳	۳	۲	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۱
در شمعدانی	۸	۹	۱۲	۵	۳	۰	۱	۱	۰	۰	۲	۱
هیدرولیز آسکولین	۸	۹	۱۴	۶	۲	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱
تیروزیناز	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
مصرف تارتارات	۵	۷	۲	۱	۰	۲	۱	۱	۰	۱	۰	۱
کاتالاز	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
تولید H_2S	۴	۴	۴	۰	۲	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰
تولید ایندول	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
تحرک	۸	۱۱	۱۱	۳	۲	۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱
رشد بی‌هوازی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
رشد هوازی	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
هیدرولیز نشاسته	۰	۳	۴	۱	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰
تحمل به نمک طعام ۵٪	۴	۵	۳	۰	۱	۱	۰	۱	۱	۰	۰	۰
هیدرولیز توئین ۸۰	۶	۹	۸	۳	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۲	۱
لیستیناز	۸	۱۰	۱۲	۴	۲	۱	۰	۱	۰	۰	۲	۱
رشد در ۴۱ °c	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
هیدرولیز کازئین	۱۲	۱۱	۱۵	۶	۱	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱
فسفاتاز	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
متیل رد	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
استوئین	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
احیای نیترات	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
شیر لیتموس (قلیائی)	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
مصرف سیترات	۱۱	۱۰	۱۶	۶	۳	۲	۱	۱	۱	۱	۲	۱
اوره‌آز	۷	۵	۱۰	۴	۱	۳	۱	۱	۱	۱	۰	۰
۳- کتولاکتوز	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
هیدرولیز ژلاتین	۷	۱۰	۱۳	۶	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۲	۱
گرم منفی (KOH)	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
تولید هستهٔ یخ	۱۰	۱۰	۱۰	۴	۲	۳	۰	۱	۱	۱	۱	۱
تولید مادهٔ بازدارنده از رشد قارچ	۶	۸	۸	۴	۲	۳	۰	۱	۱	۱	۲	۱
سوکروز	۰	۳	۴	۲	۱	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰
دی – زایلوز	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
لاکتوز	۴	۷	۶	۵	۳	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱
دی – مانوز	۹	۱۲	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
رافینوز	۶	۵	۹	۵	۳	۲	۰	۰	۱	۰	۲	۱
ال – رامنوز	۱۱	۹	۱۳	۶	۲	۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱
مالتوز	۷	۱۰	۶	۵	۳	۲	۱	۰	۱	۱	۲	۱
ملی بیوز	۱۲	۱۲	۱۵	۶	۳	۳	۱	۰	۱	۱	۱	۱

ادامه جدول ۱

آزمون / جدایه‌ها	A (۱۲)*	B (۱۴)	C (۱۶)	D (۶)	E (۳)	F (۳)	G (۱)	H (۱)	I (۱)	J (۱)	K (۲)	L (۱)
سلوبیوز	۵*	۸	۷	۵	۳	۲	۱	۰	۱	۱	۰	۱
رابینوز	۱۰	۱۲	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
رابیتول	۱۰	۱۲	۱۵	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
دی – مانیتول	۱	۳	۳	۲	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۰
ترهالوز	۱۰	۹	۱۵	۶	۳	۲	۱	۰	۱	۰	۱	۱
دی – سوربیتول	۸	۸	۱۱	۵	۳	۲	۱	۰	۱	۰	۲	۱
اینولین	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
لوولوز	۱۱	۱۳	۱۵	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۰	۱	۱
فروکتوز	۱۲	۱۲	۱۵	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۰	۲	۱
دی – گالاکتوز	۱۰	۱۲	۱۵	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
دکستروز	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
دالسیتول	۳	۳	۶	۴	۳	۳	۰	۰	۱	۰	۱	۰
اینوزیتول	۶	۸	۷	۶	۲	۳	۱	۰	۱	۰	۱	۱
اریتریتول	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
گلیسرول	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
سالیسین	۷	۹	۶	۵	۳	۳	۱	۰	۱	۰	۱	۰
گلوکز	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
نشاسته	۴	۳	۴	۰	۲	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰
ادونیتول	۶	۵	۷	۳	۳	۳	۱	۰	۱	۰	۱	۰
دی، ال – متیونین	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
اسپاراژین	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
ال – سیستئین	۴	۵	۲	۳	۳	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۰
دی، ال – لاکتات	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
دی – تارتارات	۹	۱۰	۱۴	۵	۳	۲	۱	۰	۱	۰	۲	۱
ال – تارتارات	۴	۵	۱	۰	۲	۲	۱	۱	۰	۱	۱	۰
دی، ال – تریپتوفان	۱	۴	۱	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
گلیسین	۲	۰	۵	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۱	۰	۰
ال – آلانین	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
دی، ال – تریونین	۱	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
ال – لیزین	۲	۳	۲	۵	۰	۳	۰	۱	۰	۱	۰	۰
ال – ارنیتین	۶	۳	۱۱	۵	۱	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰
سوکسینات	۱۲	۱۴	۱۶	۶	۲	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
ال – آرژنین	۸	۷	۱۵	۶	۲	۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱
پروپیونات	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
گلوتامات	۱۱	۱۲	۱۶	۶	۳	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۱
ال – والین	۴	۴	۸	۲	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰

A – جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار　B – جدایه‌های گندم　C – جدایه‌های مرکبات　D – جدایه‌های ریحان
E – جدایه‌های خاک　F – جدایه‌های خیار　G – جدایهٔ خردل وحشی　H – جدایهٔ شنگ
I – جدایهٔ انبه　J – جدایهٔ سلمه　K – جدایه‌های مرکبات شمال　L - جدایهٔ آمریکا

* عدد داخل پرانتز بیانگر تعداد جدایه‌های مورد استفاده می‌باشد.

** تعداد جدایه‌هائی که واکنش مثبت داشتند.

جدول ۲- خصوصیات بیماریزائی جدایه‌های *Pseudomonas viridiflava* از میزبان‌های مختلف

جدایه‌ها / آزمون	A (۱۲)*	B (۱۴)	C (۱۶)	D (۶)	E (۳)	F (۳)	G (۱)	H (۱)	I (۱)	J (۱)	K (۲)	L (۱)
میوهٔ نارس گیلاس	۱۲*	۱۱	۱۴	۵	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۲	۱
نهال‌های بادام:												
محل زخم روی شاخه	۹	۷	۶	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۲	۱
محل افتادن برگ	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
نهال‌های پرتقال :												
زخم روی شاخه	۶	۱	۷	۲	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰
پهنک برگ	۷	۳	۱۳	۲	۱	۱	۰	۱	۱	۰	۱	۱
محل افتادن برگ	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

A – جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار B – جدایه‌های گندم C – جدایه‌های مرکبات D – جدایه‌های ریحان
E – جدایه‌های خاک F – جدایه‌های خیار G – جدایهٔ خردل وحشی H – جدایهٔ شنگ
I – جدایهٔ انبه J – جدایهٔ سلمه K – جدایه‌های مرکبات شمال L - جدایهٔ آمریکا

* عدد داخل پرانتز بیانگر تعداد جدایه‌های مورد استفاده می‌باشد. ** تعداد جدایه‌هائی که واکنش مثبت داشتند.

در اکثر منابع منتشره عدم مصرف سوکروز را خصوصیت اصلی *Pv* ذکر می‌کنند (۱۸)، در صورتی که در برخی منابع دیگر گزارش‌هائی مبنی بر استفاده باکتری از سوکروز و تولید اسید وجود دارد (۲۱). در این پژوهش ۲۱ درصد جدایه‌های گندم، ۲۵ درصد جدایه‌های مرکبات، ۳۳ درصد جدایه‌های خاک، ۱۶ درصد جدایه‌های ریحان و جدایهٔ انبه سوکروز مصرف کرده، اما جدایه‌های هسته‌داران، خیار، شنگ، خردل وحشی، جدایه‌های مرکبات شمال و جدایهٔ امریکا سوکروز را مصرف نکردند.

تحریک واکنش فوق حساسیت توسط جدایه‌های *Pv* در توتون متغیر می‌باشد(۱). بر اساس نتایج فوق با توجه به اینکه توتون از میزبان‌های بیمارگر می‌باشد استفاده از شمعدانی جهت آزمون فوق حساسیت مناسب‌تر تشخیص داده شد.

در پژوهش حاضر کلیهٔ جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، ۵ /۷۸ درصد جدایه‌های گندم، ۸۹ درصد جدایه‌های مرکبات، ۸۳ درصد جدایه‌های ریحان، ۶۶ درصد جدایه‌های خاک، ۳۳ درصد جدایه‌های خیار و جدایه‌های خردل وحشی، شنگ و انبه قادر به ایجاد بیماری روی میوه‌های نارس گیلاس بودند.

در مایه‌زنی محل زخم برگ هیچکدام از جدایه‌ها نتوانستند روی شاخهٔ بادام ایجاد بیماری کنند. بهار و همکاران نیز گزارش نمودند که مایه‌زنی جدایه‌های *Pss* در محل زخم برگ در بیماریزائی موفقیت‌آمیز نبوده است (۲).

نمایندهٔ جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، گندم، مرکبات و ریحان ۱۰-۷ روز پس از مایه‌زنی بصورت پاشیدن (اسپری) روی برگ گندم، در ابتدا علائم آبسوختگی ظاهر شده و در نهایت باعث ایجاد سوختگی در برگ گندم شدند. همچنین این جدایه‌ها با پاشیدن روی برگ ریحان علائم خفیفی بصورت زردی برگ و لکه‌های آبسوخته تولید شد اما در مایه‌زنی با پنبهٔ آغشته به سوسپانسیون باکتری لکه‌های بافت مرده اغلب در حاشیهٔ برگ ایجاد شد. این نتیجه با منابع موجود مطابقت دارد به طوریکه جونز و همکاران (۱۹۸۴) نتایج آزمون‌های بیماریزائی در گوجه فرنگی را تفاوت دانسته و به شیوهٔ مورد استفاده مرتبط می‌دانند. جدایه‌های *Pv* روی تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی بیماریزا هستند و ظاهرا تخصص میزبانی در آنها وجود ندارد چنانچه جدایه‌های بنت القنسول در گوجه فرنگی و گل کلم ایجاد بیماری می‌کنند اما نوع علائم در هر گیاه متفاوت است به طوریکه در ساقهٔ گوجه فرنگی ایجاد لهیدگی کرده در حالیکه در بنت القنسول تولید شانکر و لکه برگی می‌کند (۱۱).

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که آزمون‌های LOPAT، آزمون‌های مناسبی جهت تفکیک جدایه‌های *Pv* از سایر سودوموناس‌های فلورسنت به خصوص *Ps* نبوده و نیاز به آزمون‌های بیوشیمیائی و تکمیلی جهت تشخیص دقیق آنها دارد. سرفنتین (۱۹۹۴) و جونز و همکاران (۱۹۸۴) جداسازی *Pv* از *Pss* را بر اساس عدم استفاده از سوکروز به همراه استفاده

از دی، ال – لاکتات و اریتریتول می‌دانند.

در مقایسهٔ نقوش الکتروفورز پروتئین‌های سلولی تفاوت‌هائی بین جدایه‌های خاک، خیار، شنگ و انبه با جدایه‌های مرکبات شمال و ریحان مشاهده شد. در مقابل بین جدایه‌های گندم، درختان میوهٔ هسته‌دار و مرکبات و نیز جدایهٔ ریحان با جدایهٔ مرکبات شمال شباهت‌هائی وجود داشت. گوهرزاده عطائی و رحیمیان (۱۳۷۳) نیز تفاوت‌هائی را بین نقوش الکتروفورز پروتئین‌های سلولی جدایه‌های ریحان، اسفناج، توتون، همیشه بهار و مرکبات با جدایهٔ استاندارد گونه ذکر کردند. لازم است جهت تفکیک جدایه‌های *Pv* و *Pss* در آینده از روش‌های دقیق‌تر نظیر روش‌های مولکولی استفاده گردد.

سپاسگزاری

نگارندگان از شورای پژوهشی دانشگاه شیراز جهت تأمین هزینه‌های این پژوهش در طرح شماره ۷۹-AG-۱۳۶۵-C۱۱۹ صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

مراجع مورد استفاده REFERENCES

۱. اخوتیان، ح.، ع. زارعی، و ح. رحیمیان، ۱۳۷۷. بیماری لکه‌برگی توتون ناشی از گونه‌های سودوموناس تجزیه کنندهٔ پکتین، خلاصه مقالات سیزدهمین کنگرهٔ گیاهپزشکی ایران. آموزشکده کشاورزی کرج، ص ۲۰۸.

۲. بهار، م.، ح. مجتهدی، و ا. اخیانی. ۱۳۶۱. شانکر باکتریایی درختان زردآلو در اصفهان، مجلهٔ بیماری‌های گیاهی جلد ۱۸، صفحات ۵۸-۶۸.

۳. شمس بخش، م. و ح. رحیمیان. ۱۳۷۶. مطالعهٔ مقایسه‌ای عوامل بلاست مرکبات و شانکر باکتریایی درختان میوهٔ هسته‌دار در مازندران. مجلهٔ بیماری‌های گیاهی جلد ۳۳، صفحات ۱۳۲-۱۴۳.

۴. رحیمیان، ح. ۱۳۷۳. لکه برگی باکتریایی ریحان. مجلهٔ بیماریهای گیاهی، جلد ۳۰، ص ۸۴.

۵. صحراگرد، ن.، ض. بنی‌هاشمی، و س. م. تقوی. ۱۳۷۶. شناسایی باکتریهای مولد هستهٔ یخ روی درختان میوهٔ هسته‌دار در استان فارس، مجلهٔ بیماری‌های گیاهی جلد ۳۳، صفحات ۲۰۹-۲۱۵.

۶. گوهرزادهٔ عطائی، ف. و ح. رحیمیان. ۱۳۷۹. مقایسهٔ استرین‌های *Pseudomonas vifidiflava* جدا شده از ریحان، اسفناج، توتون، همیشه بهار و مرکبات در استان مازندران، خلاصه مقالات چهاردهمین کنگرهٔ گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان، ص ۳۴۶.

7. Canfield, M. L., S. Baca, & L. W. Moore. 1986. Isolation of *Pseudomonas syringae* from 40 cultivars of diseased woody plants with tip dieback in Pasific Northwest nurseries. Plant Dis. 70: 647-650.
8. Fahy, P. C., & G. J. Persley. 1983. Plant Bacterial Diseases: A diagnostic guide. Academic press. Sydney. 393pp.
9. Gitatis, R., G. McDonald, R. Torrance, R. Hartely, D. R. Sumner, J. D. Gay, & W. C. Johnson, 1998. Bacterial streak and bulb rot of sweet onion: Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* in association with multiple weed hosts. Plant dis. 82: 935-938.
10. Goumans, D. D., & A. K. Chatzaki. 1998. Characterization and host range evaluation of *Pseudomonas viridiflava* from melon, blite, tomato, chrysanthemum and eggplant. Eur. J. Plant. Pathol. 104: 181-188.
11. Jones, J. B., J. P. Jones, S. M. McCarter, & R. E. Stall. 1984. *Pseudomonas viridiflava:* Causal agent of bacterial leaf blight of tomato. Plant Dis. 68: 341-342.
12. King, E. D., M. K. Ward , & D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clinic. Medic. 44: 301-307.
13. Klement, Z., G. L. Farkas, & L. Loverkovich. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology. 54: 474-477.
14. Laemmli, U. K. 1970. Cleavaye of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Natures 227: 680-685.
15. Lelliot, R. A., E. Billing, & A. C. Hayward. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonas. J. Appl. Bacteriol. 29: 470-489.

16. Schaad, N. W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd edition. APS Press. St. Paul. MN. USA. 164pp.
17. Sellam, M. A., & D. Wilcoxson. 1976. Bacterial leaf blight of wheat in Minnesota. Plant Dis. Rept. 60: 242-245.
18. Serfontein, J. J. 1994. Occurrence of bacterial brown spot of dry beans in the Transvaal province of South Africa. Plant Pathol. 43: 597-599.
19. Shakya, D. D., & F. Vinther. 1989. Occurrence of *Pseudomonas viridiflava* in seedling of radish. J. Phytopathol. 124: 123-127.
20. Suslow, T. V., M. N. Schroth, & M. Isaka. 1982. Application of rapid method for Gram differentation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology. 72: 917-918.
21. Thornley, M. S. 1960. The defferentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. J. A. Bacteriol. 3: 37-52.
22. Vantomme, R., R. Sarrazyn, M. Goor, L. Verdonck, K. Kersters, & J. Deley. 1989. Bacterial rot of chicory caused by strains of *Erwinia* and *Pseudomonas:* Symptoms, isolation and characterization. J. Phytopathol. 124: 337-365.
23. Young, J. M., G. J. Cheesmus, F. V. Welham, & W. R. Henshell. 1988. Bacterial blight of kiwifruit. Ann. Appl. Biol. 112: 91-105.

Iranian, J. Agric. Sci. Vol. 35, No. 1, 2004

A Comparison of *Pseudomonas viridiflava* Isolates from Different Hosts by Phenotypic Characteristics and Pathogenicity, Fars Province

M. RAZINATAJ[1] AND S. M. TAGHAVI[2]
1, 2, Former Graduate Student and Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Shiraz, Shiraz, Iran
Accepted May. 15, 2003

SUMMARY

Pseudomonas viridiflava (Pv) isolates collected from cereals, citrus, stone fruits, cucumber, mongo, soil and weeds during 1999-2000 in Fars Province and in Minab were compared based on phenotypic characteristics as well as pathogenicity. From a total of 950 fluorescent isolates, 49 were negative in oxidase, levan production and arginine dihydrolase but were positive in hypersensitive reaction on tobacco, pelargonium or both and were able to produce soft rot on potato tuber slices. Also 11 isolates were negative in producing soft rot on potato tuber slices or utilization of sucrose. Based on complementary biochemical and physiological tests, these 60 isolates were identified as *P. viridiflava*. Three types of colonies were observed among these isolates. Based on LOPAT (Levan production, Oxidase, Potato soft rot, Arginine dihydrolyse, and Tobacco hypersensitivity) tests, the isolates were divided into four groups.

Key words: *Pseudomonas viridiflava,* Soft rot, Phenotypic characteristics, Pathogenicity